

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



This is to certify that the annexed is a true copy of
the following application as filed with this Office.

Date of Application: March 6, 2001

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2001-062418

Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

October 26, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3093454

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

J1050 U.S. PTO
10/077096
02/14/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 3月 6日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-062418

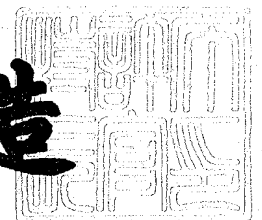
出 願 人
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

2001年10月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3093454

【書類名】 特許願

【整理番号】 12B031

【提出日】 平成13年 3月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/566

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション器具

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
 ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 佐藤 恵一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
 ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 森田 敏樹

【特許出願人】

 【識別番号】 000233055

 【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110191

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中村 和男

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プールの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション器具

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プローブ生体高分子が固定される基板と重ね合わせたときに、前記プローブ生体高分子が固定される領域と対向する領域の表面が親水性であり、その周りの領域の表面が疎水性であるシートから成ることを特徴とするハイブリダイゼーション器具。

【請求項 2】 プローブ生体高分子が固定される基板と重ね合わせたときに、前記プローブ生体高分子が固定される領域と対向する領域の表面がその周りの領域よりも窪んでいるシートから成ることを特徴とするハイブリダイゼーション器具。

【請求項 3】 前記シートの前記窪んでいる領域の表面が親水性であり、その周りの領域の表面が疎水性であることを特徴とする請求項 2 に記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項 4】 前記シートの基材が前記基板と親和性を有することを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項 5】 前記シートの基材がシリコンゴム製であることを特徴とする請求項 4 に記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項 6】 前記シートは前記基板よりもやや広いことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項 7】 プローブ生体高分子が固定されている基板と、請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載のシートとを備えることを特徴とするハイブリダイゼーション器具。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプル生体高分子とプローブ生体高分子とのハイブリダイゼーション反応を利用してサンプル生体高分子に目的とする配列が存在するか否かを分析するためのハイブリダイゼーション器具に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

従来から、生体内の分子を同定・分画するために、特に目的DNAの検出、あるいは遺伝子DNAの有無検出などのために、既知の配列をもつ核酸や蛋白質をプローブとして蛍光物質で標識したサンプルDNAとハイブリダイズさせる方法が多く用いられている。具体的には、スライドガラス上にプローブDNAを固定した、DNAチップを用いて行う。まずプローブDNAを固定したスライドガラスの上に、蛍光物質を標識したサンプルDNAを含む溶液を滴下し、つぎにその上にカバーガラスをかぶせてハイブリダイズさせて、サンプルDNAがプローブDNAに結合すると、サンプルDNAはプローブDNAと一緒に固定されるので、スライドガラスを洗浄した後に、固定されたサンプルDNAに標識されている蛍光物質を光源からの励起光で励起し、発光する蛍光を検出することでハイブリダイズしたサンプルDNAを検出することができる。

このハイブリダイゼーション反応を行うのに好適なハイブリダイゼーション器具として、ハイブリダイゼーション反応恒温槽（商品名：CHBIO）に用いられる専用カセットが知られている（日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社製）。

【 0 0 0 3 】

図6は、従来のハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。本器具は、ケース部21とトレー一体型キャップ部22とを主な構成とする（挿入体と被挿入体）。トレー一体型キャップ部22は、スライドガラスを載せるためのトレー部24と、密閉度を高めるためのシリコンゴム等からなるパッキン25を有する。ケース部21とトレー一体型キャップ部22は、とめ具23により一体化でき、ケース部21とトレー一体型キャップ部22とで密閉空間を形成するように構成されている。

図7は、一体化した状態のハイブリダイゼーション器具の概観を示す図である。図6と同じ部分には同じ符号を付けてある。一体化した状態で実際の全体の大きさは、 $94 \times 41 \times 13 \text{ mm}^3$ である。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

カバーガラスを載せるのは少ないサンプル溶液で効率的なハイブリダイゼーション反応をさせるためであるが、カバーガラスは極めて薄くて軽く、スライドガラス上に滴下したサンプル溶液の上にカバーガラスをかぶせて定位置に固設する作業は経験と技術を要するものである。最悪の場合にはカバーガラスを破損して貴重なサンプルを台無しにしてしまうこともある。

【0005】

また、上述のようにサンプル溶液は少量であり、ハイブリダイゼーション反応は比較的高温で行うので、サンプル溶液が蒸発してしまい、サンプル溶液が蒸発して残った溶液中成分は、洗浄しても容易に流されずに残ってしまうため、解析する際に、ノイズとなって現れてしまう。

本発明は、上記問題点に鑑み、容易に確実にセットすることができて、かつ、サンプル溶液の蒸発を少なくすることができるハイブリダイゼーション器具を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明のハイブリダイゼーション器具は、プローブ生体高分子が固定される基板と重ね合わせたときに、前記プローブ生体高分子が固定される領域と対向する領域の表面が親水性であり、その周りの領域の表面が疎水性であるシートから成る。

【0007】

また、本発明のハイブリダイゼーション器具は、プローブ生体高分子が固定される基板と重ね合わせたときに、前記プローブ生体高分子が固定される領域と対向する領域の表面がその周りの領域よりも窪んでいるシートから成る。

また、前記シートの前記窪んでいる領域の表面が親水性であり、その周りの領域の表面が疎水性であることで、窪んでいる領域中をサンプル溶液のみで満たすことができる。

また、前記シートの基材が前記基板と親和性を有することで、両者が密着してサンプル溶液を閉じ込める密閉度を高めることができる。

【 0 0 0 8 】

また、プローブ生体高分子が固定される基板の基材は、ガラス、プラスチック、金属などがあり、シートの基材は基板の基材によって適正なものを選択する必要がある。前記基板の基材がガラスであった場合、シートの基材がシリコーンゴム製であることで、ガラスとの密着性がある、弾力性がある、疎水性で、生化学活性があまりないために望ましい。

【 0 0 0 9 】

また、前記シートは前記基板よりもやや広いことで、シートの端をつまむことができるので、はがし易くなる。

また、本発明のハイブリダイゼーション器具は、プローブ生体高分子が固定されている基板と、上述のシートとを備える。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

以下、添付図面を参照しながら本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。

図 1 は、本発明の実施の形態 1 に係るハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。シリコーンゴムを基体とするシート 2 は、基板（図示せず）上の DNA（一般的には生体高分子）が固定されている領域に対向する領域の表面を親水性にし、その周りの領域の表面を疎水性にして、それぞれ親水性領域 3 及び疎水性領域 4 とする。シート 2 の厚みは約 1 mm である。プローブ生体高分子が固定される基板の基材は、ガラス、プラスチック、金属などがある。一般的に基板として用いられているスライドガラスは、日本規格が $76 \times 26 \text{ mm}^2$ 、米国規格が $3 \times 1 \text{ inch}^2$ (25.4 mm^2)、ヨーロッパ規格が $25 \times 75 \text{ mm}^2$ である。一般にシリコーンゴムは疎水性であり、ガラスは親水性である。

【 0 0 1 1 】

例として、シリコーンゴムを基材とするシート 2 とスライドガラスを基材とする基板を用いてハイブリダイゼーション反応を行う方法を説明する。

(1). シート 2 の親水性領域 3 にサンプル溶液をサンプル溶液がやや盛り上がる程度に滴下する。この際に、親水性領域 3 の周りが疎水性領域 4 であるため、サン

プル溶液は親水性領域 3 に選択的に載る。

(2).スライドガラスを DNA が固定されている側を下にして静かにかぶせる。このとき、シリコーンゴムはガラスとの親和性がよいため、シリコーンゴムを基体としているシート 2 はスライドガラスと密着してサンプル溶液を封じ込める。

【 0 0 1 2 】

(3).ハイブリダイゼーション反応させるために比較的高い温度で恒温状態を保つ。このため反応が進む過程でも、疎水性領域 4 に存在するわずかなサンプル溶液が蒸発して、より密着性が高まり、より密閉度が高まる。

(4).シート 2 をスライドガラスからはがす。この際に、シート 2 とスライドガラスが密着している疎水性領域 4 であっても、シリコーンゴム製のように弾力性のあるシート 2 を用いることではがしやすい。また、親水性領域 3 においてはサンプル溶液が残っているので、はがすという意識も必要もないほど簡単にはがすことができる。この際に、スライドガラスの大きさよりもシート 2 の大きさを大きくしておくことでも、シート 2 の端をつまむことができるので、はがし易くなる。

(5).その後、従来技術と同様に、スライドガラスを洗浄し、励起光で励起し、発光する蛍光を検出する。

【 0 0 1 3 】

このようなハイブリダイゼーション反応を行うことにより、密閉のためのケースやサンプル溶液の蒸発を防止するための水を用いていないにもかかわらず、少ないサンプル溶液で長時間に及ぶハイブリダイゼーション反応を安定して進めることができる。

【 0 0 1 4 】

図 2 は、本発明の実施の形態 1 に係るハイブリダイゼーション器具を使用してハイブリダイゼーション反応を行う装置の概観図である。この装置自体は従来からあるものである。この装置を用いて次のようにハイブリダイゼーション反応を行うことができる。装置本体 1 1 の上にシート 1 2 を敷いて、基板 1 3 を載せる。上述のようにこれだけでも、よく密閉することができるのであるが、さらに、パッキン 1 4 のついた装置ふた 1 5 をかぶせて恒温状態に保持してハイブリダイ

ゼーション反応を行う。このようにハイブリダイゼーション反応を行う装置は従来のものを用いることができる。

【 0 0 1 5 】

図 3 は、本発明の実施の形態 1 に係るハイブリダイゼーション器具の製造方法を説明する図である。ここでは、通常のシリコーンゴム製のシート 2 に光触媒技術により所定の領域に選択的に親水性を付与するものを説明する。

(1). シリコーンゴム製のシート 2 の表面全体に光触媒性半導体材料を含む薄膜を形成する。光触媒性半導体材料は、 TiO_2 、 ZnO 、 SnO_2 、 SrTiO_3 、 WO_3 、 Bi_2O_3 、 Fe_2O_3 からなる群から選ばれたものである（さらに詳細には、特許第 2 7 5 6 4 7 4 号公報参照）。

【 0 0 1 6 】

(2). 親水性領域 3 に相当する領域で選択的に紫外線を透過するマスク 1 を介してシート 2 に紫外線を照射して、形成されている光触媒性半導体材料の薄膜の親水性領域 3 に紫外線を照射することで、親水性領域 3 に形成されている光触媒性半導体材料の薄膜を親水性に変える。シリコーンゴムは疎水性であり、その上に上述の光触媒性半導体材料を形成しても、それだけでは疎水性のままである。したがって、疎水性領域 4 は疎水性のままである。

【 0 0 1 7 】

図 4 は、本発明の実施の形態 2 に係るハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。本実施の形態では、シリコーンゴムを基体とするシート 5 は、スライドガラス(図示せず)の DNA（一般的には生体高分子）を固定する領域に対向する領域の表面に窪み 6 を形成し、さらに窪み 6 の表面を親水性にする。その周りの領域は疎水性のままの疎水性領域 7 とする。実施の形態 2 の変形例として、窪み 6 の周りまで親水性としても、さらにその周りに疎水性領域 7 があるので、やはりサンプル溶液は閉じ込められる。

実施の形態 2 の場合は窪み 6 を形成しているので、より多くのサンプル溶液を封じ込めることになり、長時間のハイブリダイゼーション反応に適する。

【 0 0 1 8 】

図 5 は、本発明の実施の形態 3 に係るハイブリダイゼーション器具の構成を示

す図である。本実施の形態では、シリコーンゴムを基体とするシート 8 は、複数のスライドグラス（図示せず）の DNA（一般的には生体高分子）を固定する領域に対向する領域の表面に窪み 9 を形成し、さらに窪み 9 の表面を親水性にする。その周りの領域は疎水性のままの疎水性領域 1 0 とする。

実施の形態 3 の場合は 1 枚のシート 8 を用いて複数のスライドグラスでのハイブリダイゼーション反応を行うことができ、取り扱いが簡易である。

なお、本発明は上記実施の形態に限定されるものではない。

【 0 0 1 9 】

本発明はプローブ生体高分子が固定されているスライドグラスと上述のシートとの組合せであるハイブリダイゼーション器具も包含する。

親水性を付与するのに光触媒性半導体材料を用いるのではなく、親水性の塗料を塗布することでもよい。

【 0 0 2 0 】

シートの基材はシリコーンゴム製に限られない。その表面に親水性領域と疎水性領域を形成することができるもの、又は、その表面に窪みを形成することができるものであれば何でもよい。基板との密着性がある、弾力性がある、疎水性で、生化学活性のないものであれば、さらによい。

上述の図面では、シートの親水性領域の他のすべての領域を疎水性領域にしているが、親水性領域の周りを疎水性領域とすれば残りのすべての領域を疎水性領域とする必要はない。

【 0 0 2 1 】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、容易に確実にセットすることができて、かつ、サンプル溶液の蒸発を少なくすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施の形態 1 によるハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 2】

本発明の実施の形態 1 に係るハイブリダイゼーション器具を使用してハイブリダイゼーション反応を行う装置の概観図である。

【図 3】

本発明の実施の形態 1 に係るハイブリダイゼーション器具の製造方法を説明する図である。

【図 4】

本発明の実施の形態 2 に係るハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 5】

本発明の実施の形態 3 に係るハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 6】

従来のハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 7】

一体化した状態のハイブリダイゼーション器具の概観を示す図である。

【符号の説明】

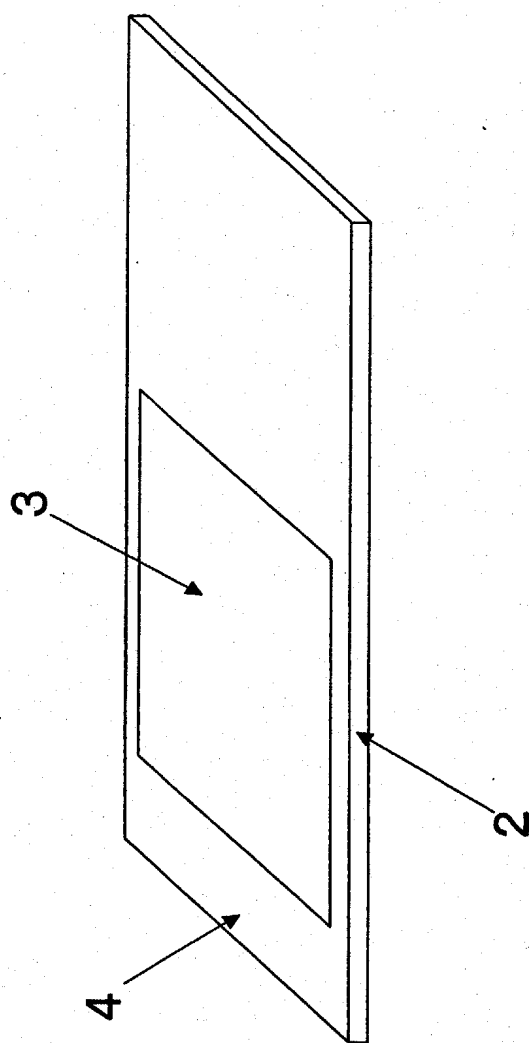
- 1 マスク
- 2 シート
- 3 親水性領域
- 4 疎水性領域
- 6 窪み
- 5 シート
- 7 疎水性領域
- 8 シート
- 9 窪み
- 10 疎水性領域
- 11 装置本体
- 12 シート
- 13 基板

- 1 4 パッキン
- 1 5 装置ふた
- 2 1 ケース部
- 2 2 トレー一体型キャップ部
- 2 3 とめ具
- 2 4 トレー部
- 2 5 パッキン

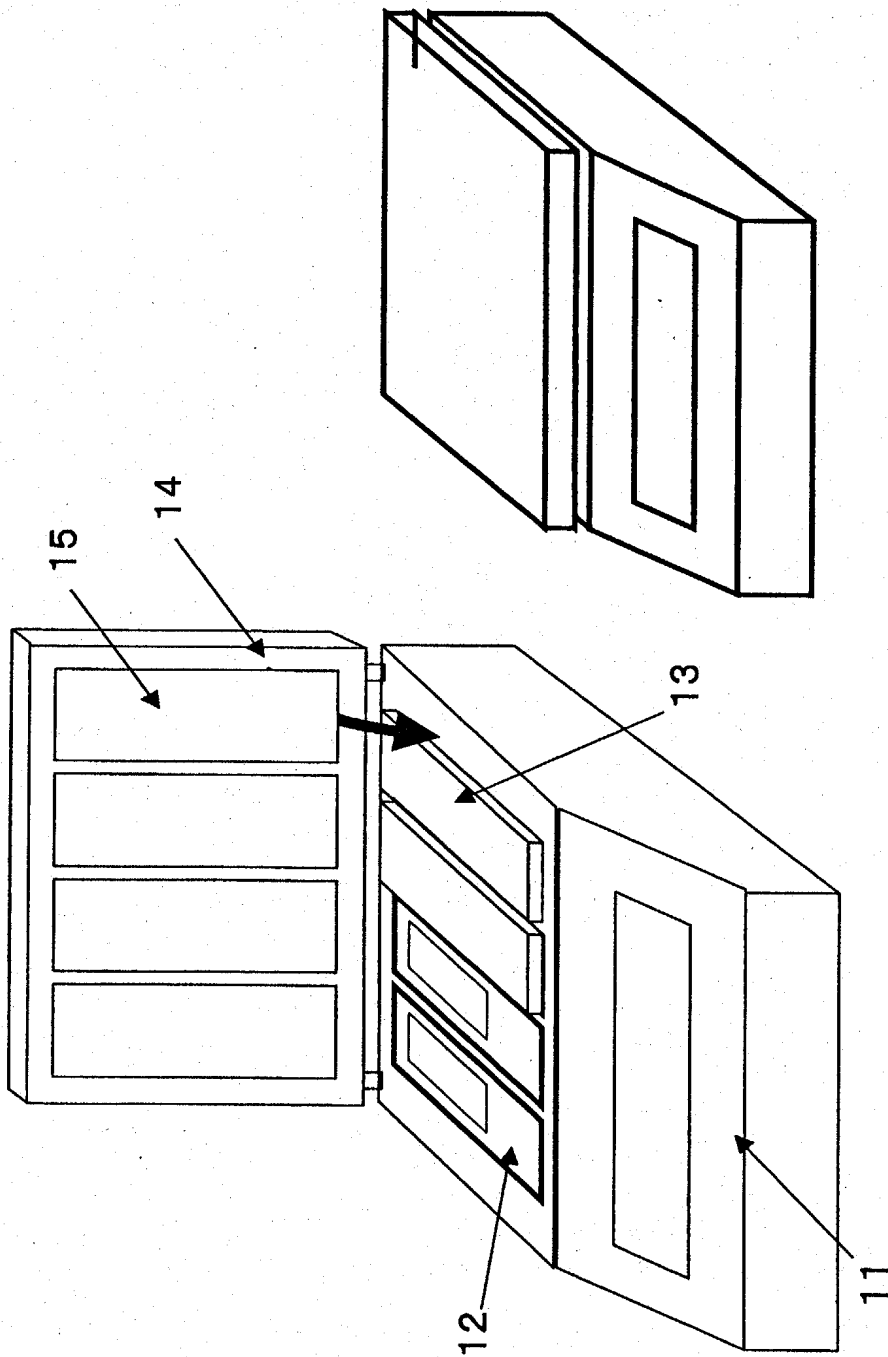
【書類名】

図面

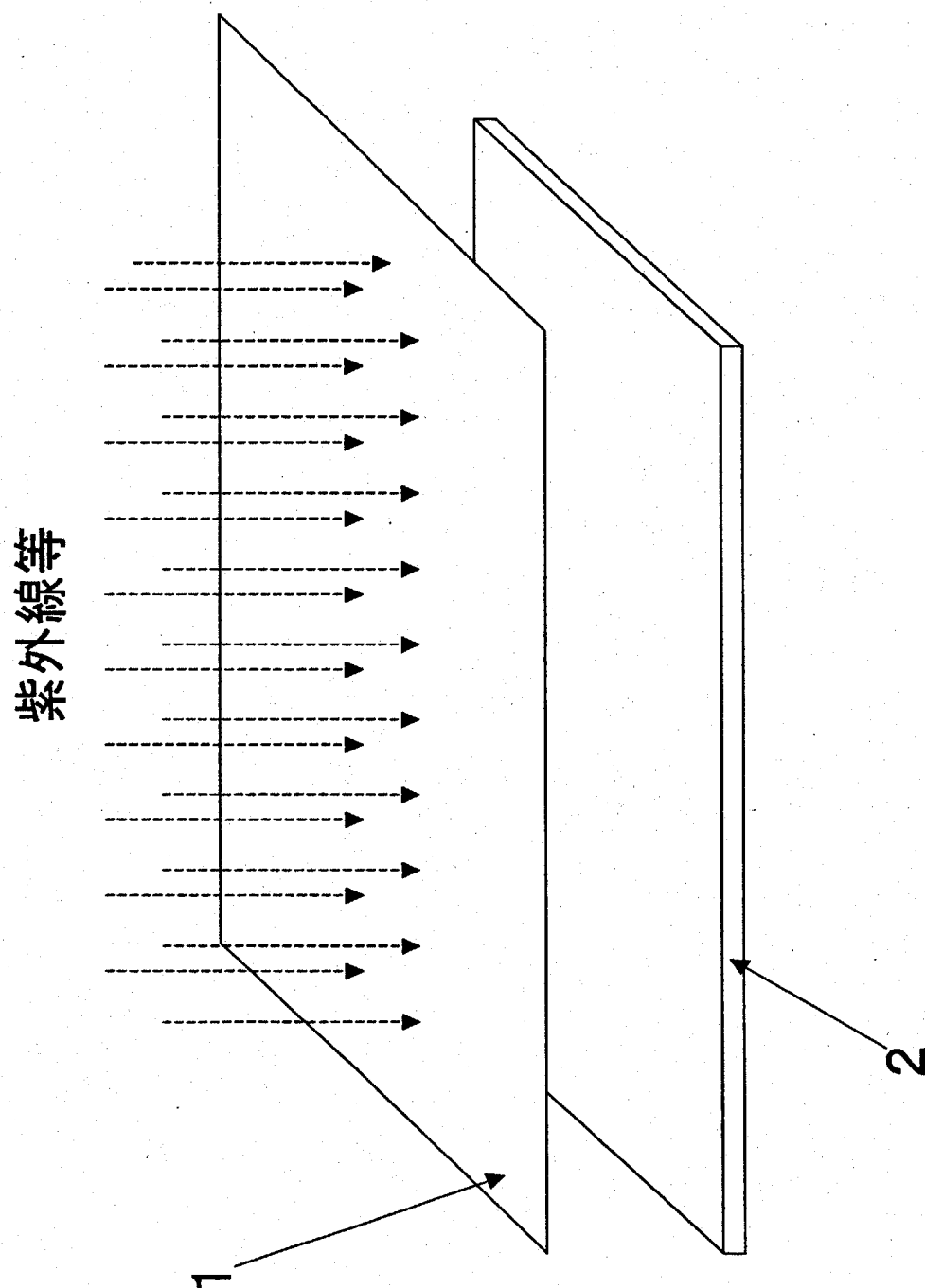
【図 1】



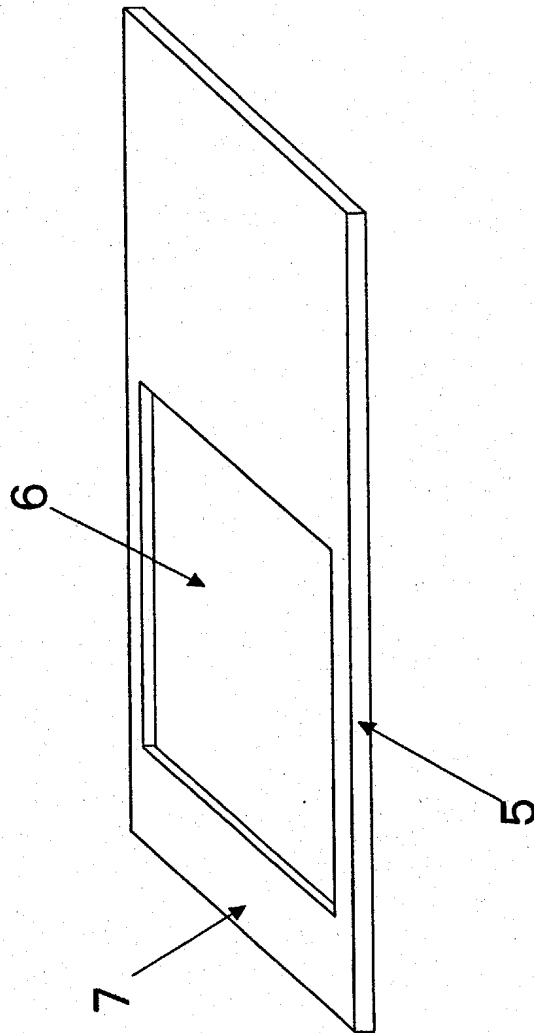
【図2】



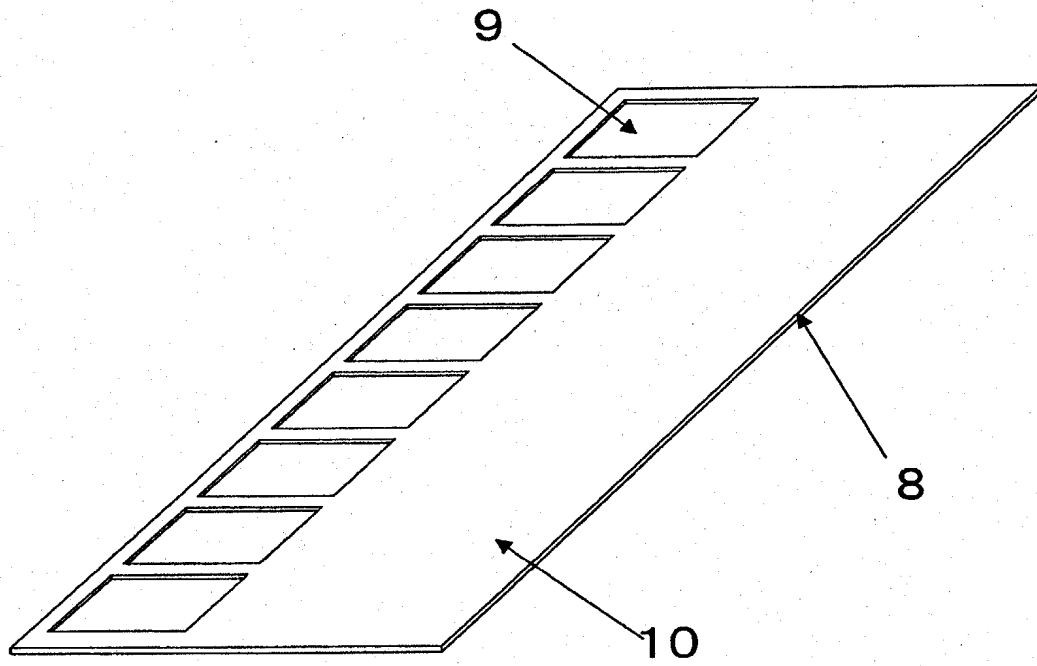
【図 3】



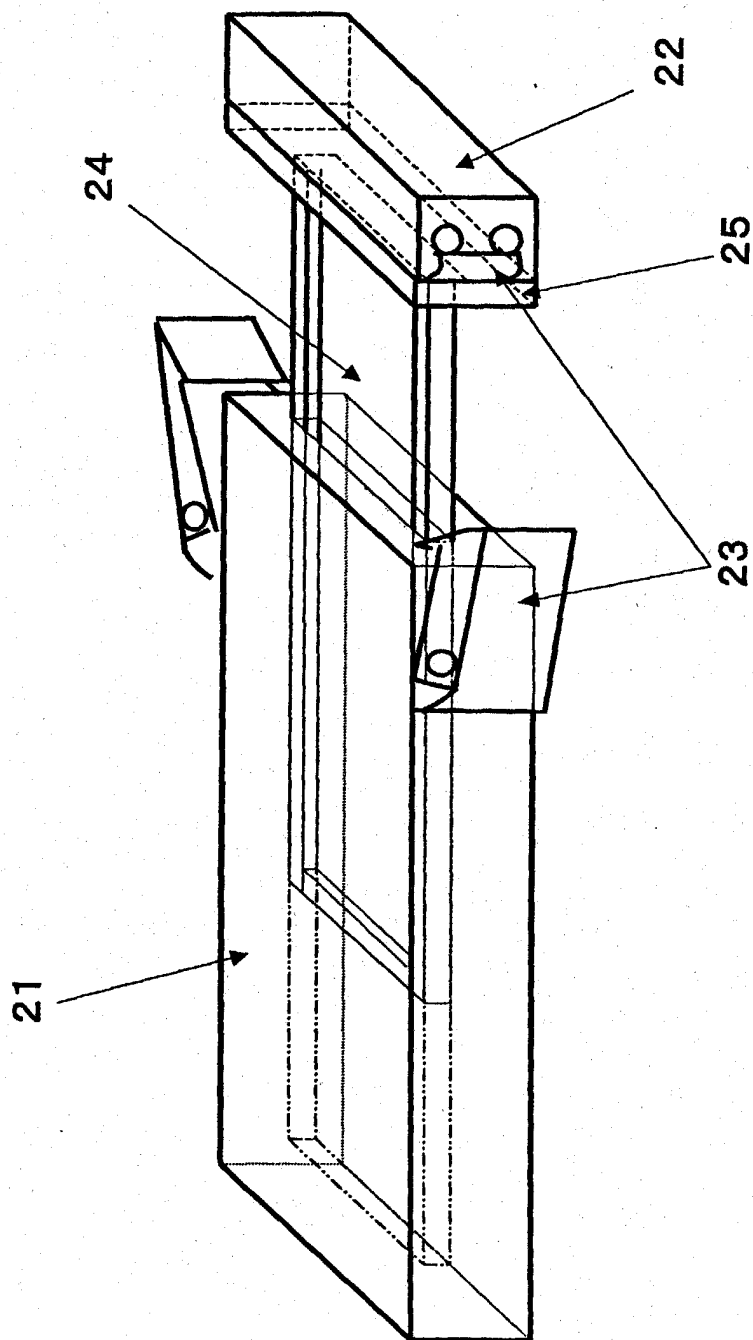
【図4】



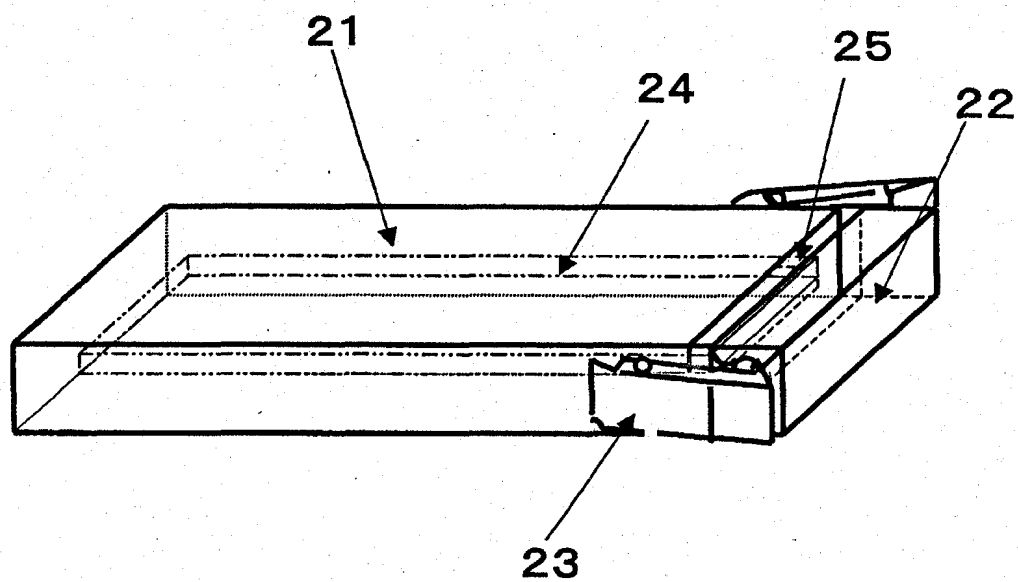
【図5】



【図6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 容易に確実にセットすることができて、かつ、サンプル溶液の蒸発を少なくすることができるハイブリダイゼーション器具を提供すること。

【解決手段】 シリコーンゴムを基体とするシート 2 は、基板（図示せず）の DNA を固定する領域に対向する領域の表面を親水性にし、その周りの領域の表面を疎水性にして、それぞれ親水性領域 3 及び疎水性領域 4 とする。これにより密閉のためのケースやサンプル溶液の蒸発を防止するための水を用いていないにもかかわらず、少ないサンプル溶液で長時間に及ぶハイブリダイゼーション反応を安定して進めることができる。

【選択図】 図 1

特2001-062418

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社